

BIOTOOLS

BIOTOOLS B & M LABS. S. A.

Fabricado por:

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
España

Tel. (34) 91 710 00 74
Fax (34) 91 505 31 18
e-mail: info@biotools.eu
www.biotools.eu

SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT

*preparaciones en pequeña escala de ADN
plasmídico puro (1 - 5 ml de cultivos)*

Instrucciones de Uso (Ref. 21.220M/1/2)

**PLEASE READ THE INSTRUCTIONS FOR USE THOROUGHLY BEFORE USING THE KIT,
ESPECIALLY IF YOU ARE NOT FAMILIAR WITH THE PROTOCOL.**

1. EXPLICACIÓN DEL KIT

El Kit **SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION** permite una rápida y fácil preparación de ADN plasmídico de alta pureza (minipreps). El kit se basa en una lisis alcalina seguido del paso de unión del ADN plasmídico a una membrana de sílica y posterior elución del ADN puro.

En un primer paso se sedimentan las células procedentes de un cultivo bacteriano (1-5 ml) y se resuspenden en Buffer R. Las células resuspendidas se someten a un proceso de lisis alcalina con SDS mediante la adición del Buffer L. El lisado resultante es neutralizado con el Buffer N que además crea las condiciones de unión a la membrana de sílica de la columna. El ADN genómico, proteínas, restos celulares, etc., son sedimentados mediante centrifugación. Se carga el sobrenadante, que es donde se encuentra el ADN plasmídico, en la columna, se centrifuga y posteriormente la columna se lava con el Wash buffer 2. Este sencillo paso de lavado es suficiente para eliminar contaminantes que hayan quedado atrapados en la membrana como sales, metabolitos y componentes celulares. Si se parte de cepas con alto contenido en endonucleasas (Como ABLE, HB101 o JM110) se recomienda realizar un lavado inicial con el Wash Buffer 1 precalentado. Finalmente el ADN plasmídico se eluye en Buffer E ligeramente alcalino y con baja fuerza iónica.

2. CARACTERÍSTICAS DEL KIT

La tecnología desarrollada en el kit **SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION** permite el aislamiento y purificación de ADN plasmídico. El protocolo así como los reactivos incluidos en el kit han sido optimizados para proporcionar un alto rendimiento y pureza del producto final. El tiempo de preparación se ha reducido al mínimo.

El kit es adecuado para cualquier plásmido siendo el tamaño más efectivo de plásmido < 10 Kb. Se han obtenido buenos resultados con plásmidos de 20 Kb, e incluso con plásmidos de gran tamaño, aunque en estos últimos el rendimiento obtenido es menor.

El ADN plasmídico obtenido es adecuado para múltiples usos como PCR, digestión con enzimas de restricción, marcaje, clonación, secuenciación, etc.

Material de Partida	Rendimiento	Tiempo por Preparación
1 - 5 ml de cultivo bacteriano	Hasta 60 µg	25 min/18 preps

3. CONTENIDO DEL KIT

SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT			
	10 Preps Ref. 21.220M	50 Preps Ref. 21.221	250 Preps Ref. 21.222
BUFFER R Buffer de resuspensión	5 ml	15 ml	5 x 15 ml
BUFFER L (concentrated) Buffer de lisis	5 ml	15 ml	5 x 15 ml
BUFFER N Buffer de neutralización	5 ml	20 ml	5 x 20 ml
Wash Buffer 1 Solución de lavado 1	6 ml	30 ml	5 x 30 ml
Wash Buffer 2 Solución de lavado 2	6 ml	12 ml	5 x 12 ml
Buffer E Buffer de elución	13 ml	13 ml	5 x 13 ml
RNase A (Liofilizada)	2,5 mg	6 mg	5 x 6 mg
BIOTOOLS Binding Columns Columnas de unión	10	50	5 x 50
Collection Tubes (2 ml) Tubos de 2 ml	10	50	5 x 50

4. REACTIVOS Y EQUIPO REQUERIDO PERO NO PROVISTO

- Etanol Molecular Grade 96-100%
- Centrífuga y tubos de 1.5 ml
- Pipetas automáticas y puntas de pipetas
- Vortex
- Centrífuga
- Equipamiento de protección individual (guantes, gafas y bata)

5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

NOTA: El Buffer N y el Wash Buffer 1 contienen hidrócloruro de guanidina que reacciona con la lejía. Evite el contacto directo entre el hidrócloruro de guanidina y el hipoclorito de sodio (lejía) u otros agentes altamente reactivos como ácidos y bases. Tales mezclas pueden producir gases nocivos. Utilice guantes y gafas.

Los reactivos incluidos en el kit pueden almacenarse a temperatura ambiente (20-25°C) siendo estables hasta su fecha de caducidad impresa en la etiqueta del Kit.

Siempre conserve los buffers bien cerrados especialmente aquellos que se van a precalentar durante el procedimiento.

El SDS (dodecil sulfato sódico) presente en el Buffer L puede precipitar si se guarda a temperaturas inferiores a 20°. Si se observa un precipitado en el Buffer L incubar el buffer a 30°-40° y mezclar bien.

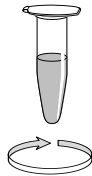


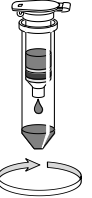

Antes de comenzar cualquier ensayo con **SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT** prepare las siguientes soluciones:


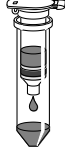

- Añada 1ml de Buffer R al vial de RNase A y mezcle por vortex. Transfiera completamente la solución a la botella de Buffer R y mezcle completamente. Indique la fecha de adición de la RNase A y guarde la solución a 4°. La solución será estable a esa temperatura durante al menos 6 meses.
- Añada el siguiente volumen de Etanol Molecular Grade 96-100% al Wash Buffer 2

	10 Preps Ref. 21.220	50 Preps Ref. 21.221	250 Preps Ref. 21.222
Wash Buffer 2 Solución de lavado 2	6 ml Añada 24 ml de Etanol Molecular Grade	12 ml Añada 48 ml de Etanol Molecular Grade	5 x 12 ml Añada 48 ml de Etanol Molecular Grade a cada botella

6. INSTRUCCIONES DE USO

Antes de comenzar con el protocolo prepare las soluciones especificadas en la sección 5.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>SEDIMENTACIÓN DE BACTERIAS Y RESUSPENSION</p> <p>Transfiera de 1 hasta 5 ml de cultivo saturado de <i>E. Coli</i> a un tubo de centrifuga. Centrifugue a 11,000 x g durante 30 seg. Elimine el sobrenadante en su totalidad.</p>		<p>RECOLECTAR CÉLULAS</p> <p>11,000 x g 30 seg</p>
2	<p>LISIS CELULAR</p> <p>Añada 250 µl de Buffer R y mezcle completamente el pellet celular mediante pipeteo o vortex. Asegúrese que no hay ningún agregado celular antes de añadir el Buffer L.</p> <p>Atención: Verifique que no hay precipitados en el Buffer L antes de seguir. Si observa algún precipitado blanco caliente el buffer durante varios minutos a 30°-40° hasta que el precipitado se disuelva completamente. Mezcle completamente y enfríe el buffer a 18°-25°.</p> <p>Añada 250 µl de Buffer L. Mezcle completamente por inversión. No use el vortex para evitar la rotura del DNA genómico (shearing). Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos o hasta que el lisado aparezca claro.</p> <p>Añada 300 µl de Buffer N. Mezcle completamente por inversión hasta que las muestras azules aparezcan completamente incoloras. No utilice vortex para evitar la rotura del DNA genómico (shearing).</p> <p>Asegúrese de neutralizar completamente para precipitar todas las proteínas y el DNA cromosómico. El lisado debe aparecer completamente incoloro sin ninguna traza de azul.</p>		<p>+ 250 µl BUFFER R</p> <p>Resuspenda</p> <p>+ 250 µl BUFFER L</p> <p>Mezcle</p> <p>RT, 5 min</p> <p>+ 300 µl BUFFER N</p> <p>Mezcle</p>
3	<p>CLARIFICACIÓN DEL LISADO</p> <p>Centrifugue 5 min a 11,000 x g a temperatura ambiente. Repita este paso en caso de que el sobrenadante no aparezca claro.</p>		<p>5 - 10 min</p> <p>11,000 x g</p>
4	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Cargue una columna (Binding Column) en un tubo colector de 2 ml (Collection tube). Transfiera 750µl del sobrenadante clarificado al interior de la columna. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. Elimine el filtrado y sitúe de nuevo la columna en el tubo colector.</p> <p>Repita este paso para cargar el resto del lisado en la columna</p>		<p>CARGUE 750µl DEL SOBRENADANTE</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>
5	<p>LAVADO DE LA MEMBRANA</p> <p>Recomendado: Si el DNA plasmídico procede de cepas con altos niveles de endonucleasas ejm. HB101... se recomienda hacer un lavado adicional con 500µl de Wash Buffer 1 precalentado a 50° y centrifugar durante 1 minuto a 11,000 g antes de añadir el Wash buffer 2</p> <p>Añada 600 µl de Wash Buffer 2 (suplementado con Etanol Molecular Grade – ver sección 5) en la columna. Centrifugue 1 min a 11,000 x g y elimine el filtrado. Ponga de nuevo la columna en el tubo colector vacío.</p>	 	<p>Opcional: +500 µl WASH BUFFER 1 (Precalentado 50°)</p> <p>1 min, 11,000 x g</p> <p>+ 600 µl WASH BUFFER 2</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>

6	<p>SECADO DE LA MEMBRANA</p> <p>Para eliminar los restos de etanol procedentes de la solución de lavado centrifugue 2 min 11,000 x g. y tire el tubo colector.</p> <p>Nota: Restos residuales de etanol procedentes de los buffers de lavado puede inhibir las reacciones enzimáticas</p>		<p>2 min, 11,000 x g</p>
7	<p>ELUCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO</p> <p>Coloque la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml (no incluido en el kit). Añada en el centro de la membrana de la columna 50µl de buffer E e incube 1 min a temperatura ambiente. Para eluir el ADN plasmídico centrifugue a 11,000 x g durante 1 min.</p>	 	<p>+ 50 µl BUFFER E</p> <p>Incube 1 min</p> <p>1 min, 11,000 x g</p>

7. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa Posible y Recomendación
Lisis celular incompleta	<p><i>Pellet no resuspendido correctamente</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Es esencial que el pellet esté completamente resuspendido antes del paso de lisis. No debe haber ningún agregado celular antes de la adición del Buffer L. <p><i>Buffer L precipitado</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - El SDS del Buffer L puede precipitar. Si observa un precipitado incube el Buffer L a 30°- 40° durante 5 minutos y mezcle bien <p><i>Demasiadas células en el pellet</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Se recomienda utilizar medio LB para el crecimiento bacteriano. Si se utilizan medios muy ricos puede que la densidad del cultivo sea demasiado alta
Rendimiento bajo	<p><i>Lisis Incompleta</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Vea las posibles causas y sugerencias descritas arriba <p><i>Precipitación subóptima y restos celulares</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - La precipitación mediante SDS es más efectiva si se centrifuga a 4° en lugar de a temperatura ambiente <p><i>Baja concentración de antibiótico durante el cultivo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Cuando se añade insuficiente cantidad de antibiótico al medio de cultivo puede haber excesivo crecimiento de las bacterias no transformadas respecto de aquellas que llevan el plásmido de interés. Asegúrese de añadir la concentración correcta de antibiótico al medio de cultivo <p><i>Cultivo bacteriano muy antiguo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - No incube cultivos durante más de 16 horas a 37° con agitación. Recomendamos el medio LB como el medio de cultivo óptimo. Si utiliza medios de cultivo ricos el tiempo de cultivo debe reducirse a menos de 12 horas <p><i>Condiciones de elución subóptimas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Utilice el Buffer E para el proceso de elución. Si usa H₂O libre de nucleasas para la elución chequee su pH. La eficiencia de elución se reduce drásticamente en Bufferes con un pH inferior a 7. <p><i>Se utilizó un plásmido con bajo número de copias</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Si se usa un plásmido con bajo número de copias (Cósmidos...) los volúmenes iniciales de cultivo se deben incrementar al menos a 5 ml.

Problema	Causa Posible y Recomendación
Lisis celular incompleta	<p>Pellet no resuspendido correctamente</p> <ul style="list-style-type: none"> - Es esencial que el pellet esté completamente resuspendido antes del paso de lisis. No debe haber ningún agregado celular antes de la adición del Buffer L. <p>Buffer L precipitado</p> <ul style="list-style-type: none"> - El SDS del Buffer L puede precipitar. Si observa un precipitado incube el Buffer L a 30°- 40° durante 5 minutos y mezcle bien <p>Demasiadas células en el pellet</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se recomienda utilizar medio LB para el crecimiento bacteriano. Si se utilizan medios muy ricos puede que la densidad del cultivo sea demasiado alta
Rendimiento bajo	<p>Lisis Incompleta</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vea las posibles causas y sugerencias descritas arriba <p>Precipitación subóptima y restos celulares</p> <ul style="list-style-type: none"> - La precipitación mediante SDS es más efectiva si se centrifuga a 4° en lugar de a temperatura ambiente <p>Baja concentración de antibiótico durante el cultivo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cuando se añade insuficiente cantidad de antibiótico al medio de cultivo puede haber excesivo crecimiento de las bacterias no transformadas respecto de aquellas que llevan el plásmido de interés. Asegúrese de añadir la concentración correcta de antibiótico al medio de cultivo <p>Cultivo bacteriano muy antiguo</p> <ul style="list-style-type: none"> - No incube cultivos durante más de 16 horas a 37° con agitación. Recomendamos el medio LB como el medio de cultivo óptimo. Si utiliza medios de cultivo ricos el tiempo de cultivo debe reducirse a menos de 12 horas <p>Condiciones de elución subóptimas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Utilice el Buffer E para el proceso de elución. Si usa H₂O libre de nucleasas para la elución chequee su pH. La eficiencia de elución se reduce drásticamente en Bufferes con un pH inferior a 7. <p>Se utilizó un plásmido con bajo número de copias</p> <ul style="list-style-type: none"> - Si se usa un plásmido con bajo número de copias (Cósmidos...) los volúmenes iniciales de cultivo se deben incrementar al menos a 5 ml.

<p>No hay extracción de DNA Plasmídico</p>	<p>No se han preparado correctamente las soluciones</p> <ul style="list-style-type: none"> - Añada el volumen correcto de Etanol Molecular Grade al wash buffer 2 (Vea el apartado 5) <p>Se han utilizado cepas ricas en nucleasas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cuando se trabaja con cepas ricas en nucleasas se recomienda trabajar manteniendo los plásmidos en hielo para evitar la degradación del DNA. - Asegúrese de seguir el paso de lavado opcional con Wash Buffer 1. Se recomienda incubar la membrana con el Wash Buffer 1 precalentado a 50° durante dos minutos antes de la centrifugación <p>Conservación inapropiada del DNA plasmídico</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cuantifique el DNA directamente tras la extracción por ejemplo mediante un gel de electroforesis. Conserve el DNA a -20° si se ha eluido en H₂O o a temperaturas inferiores a 5° si se ha eluido en el Buffer E.
<p>Baja Calidad del DNA Plasmídico</p>	<p>DNA Plasmídico nickado</p> <ul style="list-style-type: none"> - La suspensión celular ha sido incubada con el Buffer L durante más de 5 minutos <p>Contaminación por DNA genómico</p> <ul style="list-style-type: none"> - El lisado celular fue vortexeado o mezclado demasiado vigorosamente después de añadir el Buffer L. El DNA genómico se degradó y por ello se liberó <p>Aparición de un smear en un gel de agarosa</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cuando se trabaja con cepas ricas en nucleasas se recomienda trabajar manteniendo los plásmidos en hielo para evitar la degradación del DNA. - Asegúrese de seguir el paso de lavado opcional con Wash Buffer 1. Se recomienda incubar la membrana con el Wash Buffer 1 precalentado a 50° durante dos minutos antes de la centrifugación
<p>Problemas en usos posteriores del ADN plasmídico</p>	<p>Elución del DNA plasmídico en Buffer TE</p> <ul style="list-style-type: none"> - EDTA puede inhibir las reacciones de secuenciación. Purifique de nuevo el DNA plasmídico y eluya en Buffer E o en H₂O. Alternativamente el DNA plasmídico puede ser precipitado con Etanol Molecular Grade y disuelto de nuevo en Buffer E o en H₂O <p>Contaminación con etanol del ADN plasmídico obtenido</p> <ul style="list-style-type: none"> - Asegúrese de centrifugar al menos durante un minuto a 11,000 x g para eliminar completamente los restos de wash buffer 2. <p>No se ha realizado el lavado adicional con el Wash Buffer 1</p> <ul style="list-style-type: none"> - El lavado adicional con Wash Buffer 1 antes de lavar con Wash Buffer 2 incrementa la eficiencia en las reacciones de secuenciación <p>No se ha utilizado suficiente DNA plasmídico para la reacción de secuenciación</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cuantifique el DNA mediante un gel de agarosa antes de realizar la secuenciación <p>El DNA plasmídico se obtuvo a partir de un pellet que tenía demasiadas células</p> <ul style="list-style-type: none"> - Parta de no más de 3ml de cultivo saturado de <i>E. coli</i> si va a usar el DNA plasmídico para secuenciación

8. INFORMACIÓN DE PEDIDOS

SPEEDTOOLS KIT	10 PREPS	50 PREPS	250 PREPS
SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.130M	Ref. 21.131	Ref. 21.132
SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.135M	Ref. 21.136	Ref. 21.137
SPEEDTOOLS RNA VIRUS EXTRACTION KIT	Ref. 21.140M	Ref. 21.141	Ref. 21.142
SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.175M	Ref. 21.176	Ref. 21.177
SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION	Ref. 21.170M	Ref. 21.171	Ref. 21.172
SPEEDTOOLS TOTAL RNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.210M	Ref. 21.211	Ref. 21.212
SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT	Ref. 21.200M	Ref. 21.201	Ref. 21.202
SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT	Ref. 21.220M	Ref. 21.221	Ref. 21.222

9. LIMITACIONES Y GARANTÍA

A continuación, se citan una serie de advertencias y precauciones de uso. Para una información más completa, recomendamos leer la Hoja de Seguridad (MSDS), disponible en nuestra página Web (www.biotoools.eu/msds.htm), o mediante petición a nuestro Dpto. Técnico (technicalsupport@biotoools.eu).

1. Producto para uso exclusivo en investigación.
2. La documentación incluida en el kit especifica su uso, deben seguirse fielmente las instrucciones con el fin de obtener ADN de plasmídico de alta calidad.
3. Los componentes del Kit fueron testados de acuerdo a ISO 9001-2001 y EN 13485-2003.
4. El usuario es responsable de la validación del kit para determinados usos particulares, ya que el Kit no ha sido validado para una aplicación particular. El Kit puede ser utilizado en laboratorios de diagnóstico clínico siempre y cuando el laboratorio valide el kit para un sistema determinado de diagnóstico como requieren las normas CLIA'88 en Estados Unidos o las equivalentes en otros países.
5. BIOTOOLS garantiza la conformidad del kit con las especificaciones del producto. Si el kit no estuviera conforme a las mismas sería reemplazado.
6. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados: bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS (portes pagados), o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición.
7. BIOTOOLS no se responsabilizará de daños o defectos debidos al transporte. Las reclamaciones por mercancía dañada han de dirigirse al transportista; el seguro de transporte es responsabilidad del cliente.
8. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidente resultante del uso, mal uso, resultado del uso o de la incapacidad de uso del kit. Tampoco se responsabiliza de los defectos en productos o componentes no manufacturados por BIOTOOLS, o daños consecuencia de esos productos o componentes exógenos a BIOTOOLS.
9. Ninguna otra garantía de ningún tipo, directa o indirecta, expresa o implícita, incluyendo sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización, o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS.
10. La garantía de este boletín, así como las especificaciones y descripciones de este kit que aparecen en el catálogo son los únicos documentos válidos de la garantía del producto. Comunicados escritos u orales por los comerciales, distribuidores o técnicos de BIOTOOLS, excepto declaraciones escritas firmadas por un directivo autorizado de BIOTOOLS, carecen de valor alguno y no forman parte de la garantía de venta.
11. Las indicaciones/aplicaciones del producto están sujetas a cambios por lo cual se recomienda contactar con nuestro servicio técnico para obtener información actualizada de los productos de BIOTOOLS. También puede contactar su comercial o distribuidor local para una información general.
12. Las aplicaciones mencionadas en el boletín o demás documentos de BIOTOOLS tienen un carácter meramente informativo. BIOTOOLS no garantiza que todas las aplicaciones hayan sido testadas en sus laboratorios. Para más información contacte nuestro Departamento Técnico (technicalsupport@biotoools.eu).

Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de ISO 9001 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – España

© 2008 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados.